第42卷 第3期
1999年8月

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

Vol.42，No.3
Aug.，1999

棉铃虫18S核糖体RNA基因的序列分析及其分子系统学*

王 瑛 陈晓峰 刘 伟 周红章 赵 珩
（中国科学院动物研究所，北京 100080）

摘要 克隆并分析了鳞翅目棉铃虫 *Helicoverpa armigera*（Hübner）18S核糖体RNA基因（18S rDNA）的全序列，将该序列与鞘翅目、膜翅目、同翅目、双翅目、捻翅目和弹尾目各一种昆虫的同源保守区进行了比较。序列分析结果显示：鳞翅目和双翅目昆虫在18S rDNA结构上彼此较为相似，捻翅目昆虫的18S rDNA分子结构表现出与其它目昆虫有较大的差异，但相对与弹尾目昆虫的18S rDNA较为接近。该结果支持了有关捻翅目属于一个独立的目级分类阶元的论点。

关键词 18S rDNA，棉铃虫，分子系统学

真核生物核糖体的小亚基RNA由染色体基因编码，称为18S rDNA。核糖体在蛋白质生物合成过程中具有重要的生物功能。在漫长的生物进化过程中，其一级结构和二级结构基本格局变化甚少，是至今发现的DNA序列中最为保守的一类。因此，利用18S rDNA研究高级分类阶元的分子进化和分子系统学问题受到了普遍重视。已有许多种生物的18S rDNA序列被测定和分析[1]。有关昆虫18S rDNA全序列的研究，已发表的仅有鞘翅目、同翅目各一种[2,3]，双翅目两种[4,5]。尚未发表但已输入DNA数据库的有膜翅目、捻翅目和弹尾目各一种[6]。

本研究克隆并分析了一种鳞翅目昆虫即棉铃虫 *Helicoverpa armigera*（Hübner）18S rDNA的全序列，通过同源保守区比较，分析了鳞翅目与其他几目昆虫18S rDNA序列的差异程度，可为昆虫纲若干目之间的遗传距离测定及其分子进化和分子系统学研究提供定量的资料。

1 材料与方法

1.1 高分子量基因组DNA的提取

鳞翅目棉铃虫（采自河南省）基因组DNA的提取方法如下：取6龄幼虫，每头加4 mL SES缓冲液（0.2 mol/L蔗糖，50 mmol/L EDTA，100 mmol/L Tris-Cl，0.5% SDS，调至pH 9.0）。将虫体在冰中预冷的匀浆器中匀浆，然后加入蛋白酶K（10 mg/mL），使终浓度为200 μg/mL，在65℃水浴保温1 h。加5 mol/L醋酸钾使终浓度为1.2 mol/L，10 000 r/min离心15 min，湿纱布过滤，取上清，加2.5倍体积的无水乙醇，在－20℃放置30 min，

* 中国科学院动物研究所所长基金、中国科学院区系分类学科发展特别支持经费项目
1997-12-01收稿，1998-09-05收修改稿

10 000 r/min 离心 8 min，弃上清。完全凉干后加 3 mL TE 缓冲液（10 mmol/L Tris-Cl，1 mmol/L EDTA，pH 8.0），4 μL RNA 酶（10 mg/mL），使终浓度为 30 μg/mL，37℃酶解 1 h，继之酚抽提、乙醇沉淀，凉干后加 100～200 μL TE。在紫外 260 nm 波长检测 DNA 浓度，电泳检测分子量，最后置 4℃备用。

1.2 引物设计与 PCR 反应

对文献报道的 6 个目昆虫（鞘翅目、膜翅目、同翅目、双翅目、捻翅目和弹尾目）18S rDNA 的全序列（表 1）用 Goldkey 软件（军事医学科学院基础所设计）进行分析，设计了四段用于聚合酶链式反应（PCR）的引物，覆盖了昆虫 18S rDNA 的全部序列：

1： 5'-T[AC]CCTGGT[GT]GATCCTGCCAGT-3'；

2： 5'-ACTAGGGCGGTATCTGATCGC-3'；

3： 5'-GCGATCAGATACCGCCCTAGT-3'；

4： 5'-GATCCTTC[CT]GCAGGTTCACCT-3'。

表 1 本研究所分析的几种昆虫的 18S rDNA 序列数据来源

Table 1 The conservative sequences of 18S rDNA in insects from six Orders

昆虫目 Order	物种 Species	分子量 Molecular weight（bp）	基因库序号 No. of genebank
捻翅目 Strepsiptera	*Xenos vesperum*	3 316	X77784[6]
膜翅目 Hymenoptera	*Polistes dominulus*（马蜂）	1 919	X77785[6]
鞘翅目 Coleptera	*Tenebrio molitor*（黄粉甲虫）	1 921	X07801[2]
双翅目 Diptera	*Drosophila melanogaster*（果蝇）	1 995	M21017[4]
同翅目 Homoptera	*Acyrthosiphon pisum*（豌豆蚜虫）	2 469	X62623[3]
弹尾目 Collembola	*Crossodonthina koreana*（跳虫）	1 811	Z36893[6]

PCR 反应过程如下：50 ng 棉铃虫基因组 DNA 作为模板，加 25 pmol 引物，dNTP 各为 10 mmol/L，Tag DNA 聚合酶 0.5 单位，加 $MgCl_2$ 至终浓度为 5 mmol/L，2.5 μL 10 倍反应缓冲液，反应总体积 25 μL。反应在 Perkin Elemer 公司生产的 DNA Thermal Cycler 480 扩增仪上进行。反应程序为：95℃1.5 min，52℃1.0 min，72℃2.0 min，30 循环，最后 72℃延伸 10 min，4℃保存。

1.3 PCR 产物克隆及测序

按文献所述方法[7]稍作改进：PCR 反应结束，在反应液中加 1 单位 T4 DNA 聚合酶，dNTP 各 4 nmol，25℃反应 20 min。反应结束，加 2 μL 0.5 mol/L EDTA（pH 8.0），70℃反应 10 min 使酶灭活。最后加 2 mol/L NaCl 使终浓度为 0.2 mol/L 及等体积异丙醇沉淀 DNA，凉干后的 DNA 溶于 20 μL 0.1×TE；取 2 μL（约含 25～50 ng DNA）与 *Sma* I 酶切开的 pUC18 在 4℃用连接酶连接 48 h。用 Bio-Rad 公司产的 Gene Pulser 电激仪转化 JM109 大肠杆菌感受态菌，在 X-gal/IPTG 固体培养基上挑选重组子。扩大培养提取质粒 DNA。质粒 DNA 分别用限制性内切酶 *Eco* RI 或 *Bam* HI 进行酶切，与 DNA 分子量标准（λDNA/*Hin* dⅢ）及

PCR 产物进行电泳以选取正确的克隆，最后用 ABI 激光测序仪测序。

1.4　序列的比较分析

将各 18S rDNA 序列用 Pileup 软件处理，进行序列比较，选择保守性合适的区域，作为供分析使用的同源区，同源性用 phylip 3.57c（Felsenstein，1995）中 dnadis 检测，同源区序列用 phylip-dnapars（使用 Wegner 简约法，经全局重排）分析，构建系统发育树。

2　结果

2.1　克隆与测序

实验用引物 1 和引物 2 以及引物 3 和引物 4 分别经 PCR 反应，从棉铃虫基因组模板获得扩增产物，然后分别克隆在 pUC18 质粒载体上。经测序，两段序列拼接成全长的棉铃虫 18S rDNA 序列（图 1），该序列长度为1 900 bp 。

```
   1  tccctggttgatcctgccagtagttatatgcttgtctcaaagattaagccatgcatgtctcagtgcaagccgtattaagg
  81  cgataccgcgaatggctcaatatatcagttttggttccttagatcttactcagttacttggataactgtggtaattctag
 161  agctaatacatgcaatcagaactctgaccagtgatgggatgagtgcttttattagatcaaaaccaatcgacggagggcct
 241  cgcgtccgaagtcgttaattttgatgaatctggataacttttgccgatcgcatggtccagtaccggcgacgcatctttca
 321  aatgtctgccttatcaactttcgatggtagtttctgcgactaccatggttgtcacgggtaacggggaatcagggttcgat

 401  tccggagagggagcctgagaaacggctaccacatccaaggaagcagcaggcgcgcaaattacccactcccggcacgggga
 481  ggtagtgacgaaaaataacgatacgggactcttacgaagcctcgtaatcggaatgagtacactttaaatattttaacgag
 561  gaacaattggagggcaagtctggtgccagcagccgcggtaattccagctccaatagcgtatactaaaattgttgcggtta
 641  aaaagctcgtagttgcatttgtgcgccgcgctgtcggtgcaccgcatccgcggtgatactgacacgtctgcggagcatat
 721  cgtcggtgagccggcggtaatacgccggttcaatatcaaaatcctatcgcggtgctcttcggtgagtgtcgaggtgggcc

 801  gacaatttttacttgaacaaattagagtgctcaaagcgggctcaaaatgctgcttgaatatttcgtgcatggaataatag
 881  aatatgatctcggttctattttgttggttttcagaactccgaggtaatgattaatagggataactgggggcattcgtatt
 961  gcgacgttagaggtgaaattcttggatcgtcgcaagacgaacatcagcgaaagcatttgccaaaggtgttttcatcaatc
1041  aagaacgaaagttagaggttcgaaggcgatcagataccgccctagttctaaccgtaaatatgtcatctagccatccgccg
1121  acgttactacaatggctcggcgggcagcttccgggaaaccaaagattttggactccggggggagtatggttgcaaagctg

1201  aaacttaaaggaattgacggaagggcaccaccaggagtggagcctgcggcttaatttgactcaacacgggaaatctcacc
1281  aggcccggacaccggaaggattgacagattaacagctctttcttgattcggtgggtggtggtgcatggccgttcttagtt
1361  ggtggagcgatttgtctggttaattccggtaacgaacgagactctagcctgctaaataggcgtcgtcatttaggtgtgcg
1441  tggccacgtgtcacgcaactcactggcgacgtattaaaattcttcttagagggaccggcggcttcgagccgcacgagatt
1521  gagcaataacaggtctgtgatgcccttagatgtcctgggccgcacgcgcgctacactgaaggaatcagcatgttctccct

1601  ggcctagaggcccgggcaacccgctgaaactccttcgtgctggggattggggtttgcaattatcccccataaacgaattc
1681  ctagtaagcgcgagtcataagctcgcgttgattacgtccctgccctttgtacacaccgcccgtcgctactaccgattgaa
1761  tgatttagtgaggtcttcggaccgacacgcggtggcttcacggccgtcggcgttgctgggaagttgaccaaacttgatca
1841  tttagaggaagtaaaagtcgtaacaaggtttccgtaggtgaacctgcggaaggatcatta
```

图 1　鳞翅目棉铃虫 18S rDNA 全序列

Fig. 1　Sequence of 18S rDNA of *Helicoverpa armigera*（Hübner）

2.2 同源区和多变区比较

应用 Pileup 软件对鳞翅目棉铃虫 18S rDNA 序列与其它几个目昆虫的该序列进行排序处理，所得数据经优化，可以找到四段同源区（图 2）。在这四段同源序列中，各种昆虫之间有不同程度的差异。而多变区主要分布在序列的中部。在某些昆虫（如捻翅目的 *Xenos vesperum* 和同翅目的豌豆蚜虫）多变区内存在大量的插入序列。结果经进一步优化，找出了两段保守性较好的同源序列：Part 1（相当于棉铃虫 18S rDNA 第 306 至 653 bp 内区域，长 352 bp）和 Part 2（相当于棉铃虫 18S rDNA 第 921 至 1 423 bp 内区域，长 503 bp）。各种昆虫两段序列的差异如表 2。

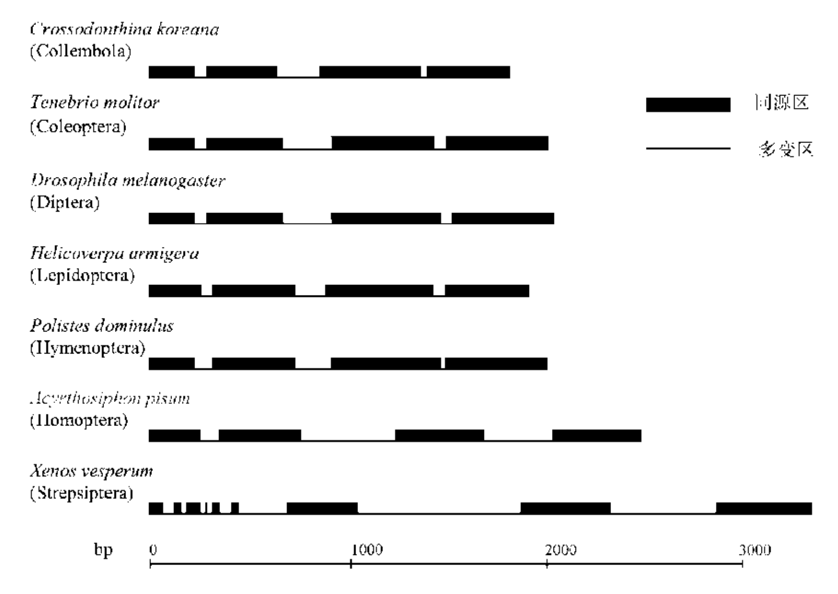


图 2 来自不同目的昆虫的 18S rDNA 长度及其同源区分布

实体表示同源区，单线表示插入多变区

Fig.2 Structural patterns of the 18S rDNA in insects from different Orders

Blocks indicate homologous parts in the sequences

表 2 用 Phylip-DNAdist 计算同源区序列的差异

Table 2 Pairwise distances between species in this study, calculated with DNAdist program in Phylip

	Collembola	Hymenoptera	Coleoptera	Diptera	Homoptera	Lepidoptera	Strepsiptera
Collembola		0.0794	0.1498	0.0814	0.0160	0.0683	0.0645
Hymenoptera	0.0383		0.1695	0.1110	0.0709	0.0814	0.0823
Coleoptera	0.0474	0.0174		0.2119	0.1373	0.1643	0.1653
Diptera	0.1020	0.0694	0.0788		0.0906	0.1085	0.1218
Homoptera	0.0697	0.0449	0.0356	0.0997		0.0662	0.0581
Lepidoptera	0.0699	0.0511	0.0448	0.0922	0.0740		0.1043
Strepsiptera	0.0927	0.0930	0.0894	0.1347	0.1009	0.1032	

左下为 Part 1 计算结果，右上为 Part 2 计算结果；

The lower triangle presents data of the sequence Part 1, and the upper triangle for Part 2

2.3　系统发育关系分析

采用 phylip 3.57c（Felsenstein，1995 ）中的 dnapars（使用 Wegner 简约法，经全局重排）对两段保守性最强的同源序列数据（Part 1 和 Part 2 以及 Part 1+2）进行分析。对 Part 1 的分析可以得到计算步数相同的 16 个支序图，经过优化得到一个结果，而对 Part 2 或 Part 1+2 进行分析，都只得到一种结果，并且是相同的（图 3）。由于 Part 2 比 Part1 序列更长且保守性更强，其分析结果应更可靠。将两部分合并（Part 1+2）的分析结果更加证明了这一点。我们认为图 3b 的结果较为可靠，从中我们可以得出以下一些有意义的论点：

（1）鳞翅目与双翅目系统关系最为接近；由于与古老的弹尾目的遗传距离最远，故应认为这两个目是最为进化的昆虫类群。

（2）捻翅目与弹尾目的遗传距离较为接近，也是一种较古老的类群。由于捻翅目与所研究的几个目差异同样非常显著，作为一个独立的目级阶元应是合理的。

（3）弹尾目在上述进化树上处在最原始的位置，证实该目昆虫确是一般所认为的是较古老的类群。

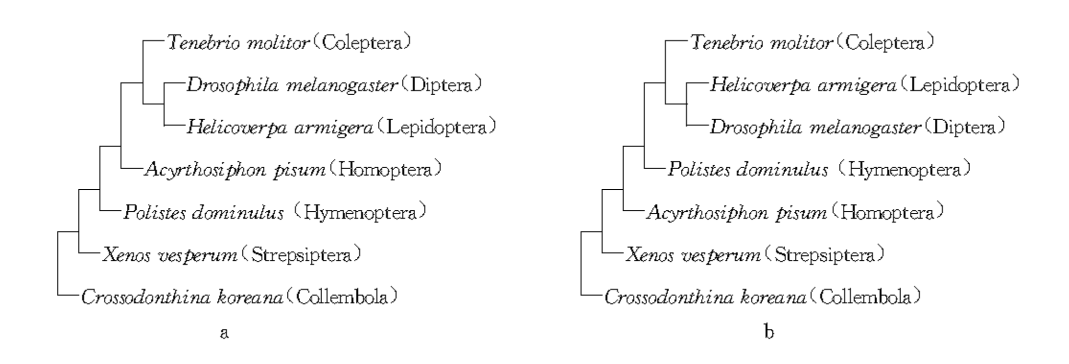


图 3　用 Phylip-DNApars 分析系统发育关系

a. 由 Part 1 序列得到的结果；b. 由 Part 2 或 Part 1+2 序列得到的结果

Fig.3　Phylogenic relationship calculated with Phylip-DNApars，based on data of sequence Part 1（a），and Part 2 or Part 1+2（b）

3　讨论

我们选择 18S rDNA 作为昆虫纲目级阶元关系的研究指标，理由在于 18S rDNA 进化速度极慢，平均一亿年仅变化 5.5%，适合于研究高级分类阶元的系统发育关系。进化的本质是基因的变异，反映在 DNA 序列的变化。一般规律是相近物种的相似性大于亲缘关系远的物种。在各种用于分类学研究的分子生物学方法中，序列分析可以提供物种遗传距离的精确定量关系。18S rDNA 为分类学研究提供了极有价值的材料。再者，18S rDNA 有较好的研究基础，许多昆虫的 18S rDNA 已被测序（或发表或输入数据库中），这使我们的研究有丰富的资料可资比较。

就 18S rDNA 整个序列而言，其 5′端（前半部分）不如 3′端（后半部分）保守性强，因

此5′端部分曾被用于一些较低分类阶元的研究，如同翅目内科和属一级的系统进化[8]。在本项研究的结果里也可看出，同源区 Part 1 不仅比 Part 2 短，且其保守性比 Part 2 低（表2）。当用序列较长的 Part 2 或 Part 1+2 合并进行分析时，能得到一致的结果，所建立的系统进化关系也与经典分类学的系统树相符合，说明18S rDNA 的3′端部分可更好地用于高级分类阶元的分子分类学研究。此外，本实验不仅提供了尚未见报道的鳞翅目棉铃虫18S rDNA 的全序列，而且在序列分析的过程中，给出了存在争议的捻翅目的一种分类结果。由于捻翅目在形态上的复杂多变及其独特的寄生生活方式，从1793年 Rossi[9]首次报道该目的新记录至今已有两个世纪，但对其分类地位仍无统一的认识。有的学者认为捻翅目应单独列为一个目，或仅是鞘翅目里的一个科[10,11]。还有的学者更认为捻翅目与毛翅目、鳞翅目亲缘关系最近[12]。根据本研究的分析结果，捻翅目单独成为一个目似更合理，它与鳞翅目的亲缘关系相去甚远。

应用分子生物学技术可为系谱的重建与确立提供精确的定量依据，运用计算机程序可对获得的数据进行较为合理的分析处理。这两项技术仍在不断发展完善中，将会对今后分子系统学的发展起到极大的推进作用。

参 考 文 献（References）

1 Neeb J，Van de peer Y，Hendricks L *et al*. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. Nucleic. Acids Res.，1990，18（Suppl）：2 237～2 317

2 Hendriks L，De Baere R，Van Broeckhoven C *et al*. Primary and secondary structure of the 18S ribosomal RNA of the insect species *Tenebrio molitor*，FEBS Lett.，1988，232：115～120

3 Kwono Y，Ogino K，Lshikawa H. The longest 18S RNA ever known nucleotide sequence and presumed secondary structure of the rRNA of pea aphid *Acyrthosiphon pisum*. Eur. J. Biochem.，1991，202：827～833

4 Tautz D，Hancock J M，Webb D A *et al*. Complete sequence of the rRNA genes of *Drosophila melanogaster*. Mol. Bio. Evol.，1988，5：366～376

5 Baldridge G D，Fallon A M. Nucleotide sequence of a mosquito 18S ribosomal RNA gene. Biochem. Biophys. Acta，1991，1089：396～340

6 National Center for Biotechnology Information，Entrez Genbank Release 16.0，1996

7 王 瑛. PCR产物直接分子克隆的比较研究. 生物工程进展，1996，3：55～57

8 Carmean D，Kimsey L S，Berbeet M L. 18S rDNA sequences and the holometabolous insects. Molecular Phylogenetics and Evolution，1992，1（4）：270～278

9 Rossi P. Observations sur un nouvean genre d'insecte voisin des Ichneumons. Bull. Soc. Philomanth.，1793，1：49

10 Henning W. Insect Phylogeny，New York：Academic Press，1981

11 Crowson R A. The phylogeny of Coleoptera. Annu. Rev. Entomol.，1960，5：111～134

12 Kinzelbach R K. Morphologische Befunde an Fächerflülern und Ihre Phylogenetische Bedeutung（Insecta：Strepsiptera）. Zoologica，1971，119（1/2）：1～256

SEQUENCE OF THE 18S RIBOSOMAL RNA GENE OF COTTON BOLLWORM（*HELICOVERPA ARMIGERA*）AND MOLECULAR SYSTEMATICS ANALYSIS

Wang Ying　Chen Xiaofeng　Liu Wei　Zhou Hongzhang　Zhao Heng

（Institute of Zoology，Academia Sinica，Beijing　100080）

Abstract　The entire sequence of the 18S ribosomal RNA gene（18S rDNA）of the cotton bollworm（*Helicoverpa armigera*）has been cloned and sequenced. As compared with conservative homologous sequences of other six insects from different Orders，it is found that the 18S rDNA of the cotton bollworm（Lepidoptera）is structurally more similar to that of the fruitfly *Drosophila melanogaster*（Diptera），suggesting a closer phylogenetic relationship between the two Orders. Phylogenetic relationship analysis reveals the Strepsiptera is closer to Collembola， and indicates being an independent ancient branch in phylogeny.

Key words　18S rDNA，*Helicoverpa armigera*，molecular systematics